

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA
FRAÇÃO SOLÚVEL DO BIODIESEL DE
SOJA**

Gabriela Vieira

Orientador: Prof. William Gerson Matiasl

Co-orientadora: Cátia Regina Silva de
Carvalho Pinto

2010/1



Gabriela Vieira

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA
FRAÇÃO SOLÚVEL DO BIODIESEL DE
SOJA**

Florianópolis - 2010

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC
Centro Tecnológico – CTC
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA
FRAÇÃO SOLÚVEL DO BIODIESEL DE
SOJA**

Gabriela Vieira

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Florianópolis – 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
SANITÁRIA E AMBIENTAL

**“AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DA
FRAÇÃO SOLÚVEL DO BIODIESEL DE
SOJA”**

GABRIELA VIEIRA

Trabalho submetido à Banca Examinadora como parte dos
requisitos para Conclusão do Curso de Graduação em
Engenharia Sanitária e Ambiental–TCC II

BANCA EXAMINADORA:


Cátia Regina Silva de Carvalho Pinto


Cristina Henning da Costa

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
JULHO/2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor e orientador William Gerson Matias pelas oportunidades de pesquisa junto ao LabTox e à atenção dada durante execução deste trabalho, mesmo estando fisicamente distante.

À professora Catia Regina Silva de Carvalho Pinto por estar sempre disposta a ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

À minha família, especialmente aos meus pais Carlos e Ivete, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha graduação.

Aos colegas do LabTox, especialmente à Cristiane Fuzzinato, Cristina Costa, Silvia Mellegari, Juliana do Carmo, Juliana Muller, Letícia Flohr, Moacyr Tomazella e Aliatir Silveira Filho por estarem sempre presentes, dispostos a ajudar e aconselhar.

À Eliani, pela paciência e bom humor no dia-a-dia do LIMA.

À minha amiga de todas as horas, Jully.

À todos os meus amigos e colegas que fizeram parte da construção da minha vida acadêmica.

ÍNDICE

2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO CENTRAL:	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Biodiesel	14
3.1.1. <i>Legislação Biodiesel</i>	15
3.2 Toxicologia	16
3.3 Ecotoxicologia	16
3.4 Testes de Toxicidade	17
3.4.1 <i>Teste de Toxicidade Aguda</i>	18
3.4.2 <i>Teste de Toxicidade Crônica</i>	18
3.5 Seleção do Organismo-teste	19
3.6 Teste de Toxicidade com <i>Daphnia magna</i> ..	20
3.6.1 <i>Cultivo de Daphnia magna</i>	21
3.6.2 <i>Testes de Sensibilidade com Daphnia Magna</i>	23
3.7 Teste de Toxicidade com <i>Vibrio fischeri</i> ...	23
3.8 Teste de Toxicidade com Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	25
4. METODOLOGIA	26

4.1 Biodiesel de Soja produzido pela BIOPAR – Paraná	26
4.2 Amostragem do Biodiesel de Soja.....	27
4.3 Ensaio de Lixiviação.....	27
4.3.1 Lixiviação com Homogeneizador.....	28
4.3.1 Lixiviação com Agitador Magnético ...	28
4.4 Testes de Toxicidade Aguda	30
4.4.1 Teste de Sensibilidade com <i>Daphnia Magna</i>	30
4.4.1 Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia Magna</i>	31
4.4.2 Testes de Toxicidade Aguda com <i>Vibrio fischeri</i>	33
4.4.3 Testes de Toxicidade Aguda com <i>L. sativa</i>	34
4.5 Testes de Toxicidade Crônica	36
4.5.1 Testes de Toxicidade Crônica com <i>Daphnia magna</i>	36
4.5.2 Testes de Toxicidade Crônica com <i>Vibrio fischeri</i>	38
5. RESULTADOS	38
5.1 Testes de Sensibilidade.....	38
5.1.1 Teste de Sensibilidade com <i>Daphnia magna</i>	38

5.1.2 Testes de Sensibilidade com <i>Vibrio fischeri</i>	39
5.2 Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i>	39
5.2.1 Resultados de Toxicidade Aguda para Fração Solúvel em Água A – FSA-A	40
5.2.2 Resultados de Toxicidade Aguda para Fração Solúvel em Água A – FSA-B	40
5.3 Testes de Toxicidade Crônica com <i>Daphnia magna</i>	41
5.3.1 Resultados de Toxicidade Crônica para Fração Solúvel em Água A – FSA-A	42
5.3.1 Resultados de Toxicidade Crônica para Fração Solúvel em Água A – FSA-B	47
5.4 Testes de Toxicidade com <i>Vibrio fischeri</i>	51
5.5 Testes de Toxicidade com <i>Lactuca sativa</i>	52
5.5.1 Resultados para Fração Solúvel em Água A – FSA-A	52
5.5.2 Resultados para Fração Solúvel em Água A – FSA-B	55
6. CONCLUSÃO	58
7. RECOMENDAÇÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXO	65
9.1 Testes de Sensibilidade com <i>Daphnia magna</i>	65

9.2 Testes de Toxicidade Aguda com D. Magna	67
9.2.1 Resultados para Amostra FSA-A	67
9.2.2 Resultados para Amostra FSA-B.....	71
9.3 Testes de Toxicidade Crônica com D. Magna	74
9.3.1 Resultados para Amostra FSA-A	74
9.3.1 Resultados para Amostra FSA-B.....	80

RESUMO

A necessidade de combustíveis menos poluentes e com viabilidade de produção têm feito com que combustíveis alternativos aos petrocombustíveis sejam estudados e desenvolvidos, dentre eles, podemos destacar o biodiesel de soja. Por outro lado, por se tratarem de novos produtos, poucas são as informações a respeito dos possíveis problemas relativos à sua exposição e manipulação, acidentes de transporte ou vazamentos acidentais, refletindo assim problemas tanto no âmbito de impactos ao ambiente quanto à população. Desta forma, através de estudos ecotoxicológicos, o presente trabalho avaliou a toxicidade da fração solúvel do biodiesel de soja (FSA). As amostras foram obtidas através de duas distintas metodologias de lixiviação, afim de se comparar possíveis diferenças de resultados. Através de testes toxicológicos, agudo e crônico, com três diferentes organismos-teste, foi possível verificar a toxicidade da FSA. As amostras apresentaram toxicidade aguda para os organismos *Daphnia magna*, *Vibrio fischeri* e *Lactuca sativa*. Também verificou-se toxicidade crônica para os organismos *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, para ambas as amostras. Assim, conclui-se que a fração solúvel do biodiesel de soja apresenta risco potencial tóxico, podendo causar alterações no ambiente ao qual estiver em contato, seja ele terrestre ou aquático.

Palavras-chave: toxicidade aguda, toxicidade crônica, biodiesel de soja.

1. INTRODUÇÃO

A produção de combustíveis alternativos tem sido foco de estudos e pesquisas científicas nos últimos anos. A necessidade de combustíveis menos poluentes e com viabilidade de produção faz com que sejam desenvolvidos combustíveis alternativos aos petrocombustíveis, de origens variadas, como por exemplo os biodieseis de mamona, alga e soja.

A ANP (Agência Nacional de Petróleo) estima que a atual produção brasileira de biodiesel seja da ordem de 176 milhões de litros anuais, capacidade que terá que ser triplicada até o ano de 2012, com a necessidade da adição de 5% de biodiesel ao petrodiesel.

O Brasil apresenta grandes vantagens para produção de biocombustíveis, pois apresenta geografia favorável, situa-se em uma região tropical, com altas taxas de luminosidade e temperaturas médias anuais. Associada a disponibilidade hídrica e regularidade de chuvas, torna-se o país com maior potencial para produção de energia renovável. Dessa forma, o biodiesel produzido a partir da soja tem se destacado no cenário nacional, pela disponibilidade da biomassa e pela facilidade de produção. Atualmente a cultura da soja é a única com escala suficiente para a sustentação de um programa de biodiesel no âmbito nacional (Portal Biodiesel.br). Diversas empresas produtoras já estão credenciadas pelo governo federal para produzirem o biodiesel de soja.

Problemas relativos à exposição ao produto durante a manipulação dos mesmos, acidentes com tombamento de caminhões transportadores ou vazamentos acidentais refletem problemas tanto no âmbito de impactos ao ambiente, aquáticos ou terrestres, quanto à população.

A avaliação da toxicidade constitui uma ferramenta importante para se avaliar os efeitos gerados por determinadas substâncias, neste caso, do biodiesel de soja. Através de testes agudos e crônicos é possível avaliar os riscos da fração solúvel do biodiesel, e assim, auxiliar através dos dados gerados, na elaboração de planos de contingência e amenizar possíveis problemas de saúde pública e ambiental. Portanto, um conjunto significativo de dados toxicológicos, poderá além de contribuir para os conhecimentos acerca das substâncias, com ênfase em seus possíveis efeitos tóxicos, constituir uma ferramenta estratégica de auxílio à minimização de impactos ambientais e de saúde pública.

O objetivo principal do presente trabalho é avaliar a toxicidade da fração solúvel do biodiesel de soja, através da avaliação dos efeitos agudos que será realizada através de três diferentes metodologias, com três diferentes organismos indicadores ou espécies-teste: bactérias luminescentes (*Vibrio fischeri*), microcrustáceos de água doce (*Daphnia magna*) e sementes de alface (*Lactuca sativa*). Já os testes para avaliação de toxicidade crônica foram utilizadas apenas bactérias luminescentes (*V. fischeri*) e microcrustáceos (*D. magna*).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO CENTRAL: Verificar efeitos tóxicos da fração solúvel do biodiesel de soja.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a toxicidade aguda da fração solúvel do biodiesel de soja através de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, *Lactuca sativa* e *Vibrio fischeri*;
- Avaliar a toxicidade crônica da fração solúvel do biodiesel de soja através de testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*;
- Comparar duas metodologias de lixiviação para obtenção da fração solúvel do biodiesel de soja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biodiesel

Embora o conceito sobre biodiesel esteja sob discussão, este termo pode ser empregado para descrever ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (monoésteres alquílicos) derivados de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais (Geris *et al*, 2007).

De acordo com a Lei nº 11.097, de 13 de setembro de 2005 biodiesel é um “biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento, para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.”

Já o portal do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (<http://www.biodiesel.gov.br/>) define o termo como “um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis, que pode ser obtido por diferentes processos tais como o craqueamento, a esterificação ou pela transesterificação. Pode ser produzido a partir de gorduras animais ou de óleos vegetais, existindo dezenas de espécies vegetais no Brasil que podem ser utilizadas, tais como mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso e soja, dentre outras”.

Segundo o Gerpen *et al* (2006) o biodiesel pode ser produzido de uma grande variedade de matérias-primas. Estas matérias-primas incluem a maioria dos óleos vegetais (p.ex, os óleos de soja, caroço de algodão, palma, amendoim, colza/canola, girassol, açafrão, coco) e gorduras de origem animal (usualmente sebo), bem como óleos de descarte).

Para que o biodiesel seja produzido, óleo vegetais e gorduras animais são submetidos a uma reação química denominada transesterificação. Segundo Neto (1999) a reação de transesterificação de óleos vegetais com álcoois primários pode ser realizada tanto em meio ácido quanto em meio básico. A reação de síntese, geralmente empregada a nível industrial, utiliza uma razão molar óleo:álcool de 1:6 na presença de 0,4% de hidróxido de sódio ou de potássio.

Além de ser totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, o biodiesel ainda apresenta várias vantagens adicionais em comparação com este combustível fóssil (Gerpen *et al*, 2006).

3.1.1. Legislação Biodiesel

Algumas leis, portarias e decretos foram criados no Brasil para padronizar e controlar a produção e a comercialização do Biodiesel, sendo algumas delas citadas abaixo. Destaca-se que nenhuma delas trata ou menciona o nível de toxicidade do produto ou qual nível de toxicidade permitido.

Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005 Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências.

Decreto de 23 de dezembro de 2003 Institui a Comissão Executiva Interministerial encarregada da implantação das ações direcionadas à produção e ao uso de óleo vegetal - biodiesel como fonte alternativa de energia.

Decreto de 02 de julho de 2003 Institui Grupo de Trabalho Interministerial encarregado de apresentar estudos sobre a viabilidade de utilização de óleo

vegetal - biodiesel como fonte alternativa de energia, propondo, caso necessário, as ações necessárias para o uso do biodiesel.

Portaria ANP 240, de 25 de agosto de 2003 Estabelece a regulamentação para a utilização de combustíveis sólidos, líquidos ou gasosos não especificados no País.

3.2 Toxicologia

Truhaut (1974), *apud* Matias (2009) definiu a toxicologia como a disciplina que estuda as substâncias tóxicas ou venenos, quer dizer às substâncias que provocam alterações ou perturbações das funções do organismo conduzindo a efeitos nocivos no qual o mais grave, de toda evidência, é a morte do organismo em questão.

O'Brein *apud* Matias (2009) reserva o uso deste termo ao estudo dos mecanismos pelo qual as substâncias tóxicas exercem seus efeitos.

Chasin & Azevedo (2003) definem Toxicologia como a ciência que tem por objetivo estudar os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, tanto no plano analítico como do ponto de vista fisiológico e bioquímico.

3.3 Ecotoxicologia

Segundo a Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (SETAC), a ecotoxicologia é a ciência que tem como princípio básico o estudo dos efeitos dos agentes físicos, químicos e biológicos sobre os organismos vivos, particularmente sobre populações e comunidades em seus ecossistemas, incluindo as formas de transporte, distribuição, transformação, interações e destino final destes agentes nos diferentes compartimentos do ambiente.

Para Laurini (2007) a ecotoxicologia se insere nas Ciências do Ambiente como ferramenta básica e essencial que subsidiará através do conhecimento, a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico potencial ou real, determinado pelo uso e pelo lançamento de agentes químicos no ambiente.

Segundo Chasin & Pedroso (2003) o termo ecotoxicologia é empregado para descrever o estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos, através de substâncias químicas liberadas no ambiente que interagem entre si, através de suas vias de transferência entre os meios também denominados de compartimentos ambientais.

3.4 Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade são utilizados para avaliar os efeitos causados à(s) espécie(s)-teste(s) em geral animais aquáticos que sejam representativos dentro de um ambiente de estudo, quando submetidos a várias concentrações de uma ou mais substâncias ou fatores ambientais, durante um determinado período de tempo, tendo como finalidade detectar os possíveis efeitos letais e/ou subletais destas condições (GHERARDI-GOLDSTEIN et al, 1990).

Segundo Laitano & Matias (2006) testes de toxicidade podem ser definidos como procedimentos nos quais as respostas de organismos-teste são utilizadas para detectar ou avaliar os efeitos adversos ou não de uma ou mais substâncias sobre os sistemas biológicos.

Ensaio biológicos permitem verificar o efeito de todas as substâncias contidas na água que estão biologicamente disponíveis, assim como avaliar a resultante de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (LANZER et al, 2007).

Em muitos países a realização dos bioensaios já é uma exigência para a avaliação de efluentes e substâncias, uma vez que análises físico-químicas convencionais não têm precisão adequada para determinar a influência do xenobiótico e seus fatores toxicológicos.

3.4.1 Teste de Toxicidade Aguda

O efeito toxicológico agudo é uma resposta rápida e muitas vezes abrupta dos organismos aquáticos a um determinado estímulo, que se manifesta em geral num intervalo de 0 a 96h. (MACHADO, 2005). Segundo Zagatto e Bertoletti o ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias.

O efeito agudo se manifesta dentro de períodos curtos (horas ou dias) de exposição dos organismos aquáticos a um agente nocivo, causando quase sempre a letalidade. Pode também ocorrer a imobilidade à alguns microcrustáceos (Knie e Lopes, 2004).

3.4.2 Teste de Toxicidade Crônica

O efeito toxicológico crônico refere-se a uma resposta referente a determinado acúmulo que continua por um longo período, podendo abranger partes ou todo o ciclo de vida dos organismos (MACHADO, 2005).

A toxicidade por dose repetida compreende os efeitos toxicológicos gerais em consequência da exposição diária a uma substância durante a maior parte da vida útil (exposição crônica).

Os testes de ecotoxicidade crônica, à semelhança do que ocorre com os agudos, também devem ser avaliados em níveis tróficos diferentes e visam à determinação da concentração de efeito não observado

(CENO). São conduzidos durante 1/10 ou mais do ciclo de vida do organismo enfocado, sendo observados os efeitos subletais e fisiológicos (efeitos sobre o crescimento e a reprodução (AZEVEDO & CHASIN, 2004).

Os resultados são expressos em Concentração de Efeito Não Observado (CENO), que é a maior concentração da substância testada que não provoca efeito quando comparada ao controle; e em Concentração de Efeito Observado, indicando a menor concentração testada que causa efeito significativo se comparada ao controle.

Segundo Brentano (2006), o teste crônico é importante e complementar ao teste agudo, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeito sobre a biota.

3.5 Seleção do Organismo-teste

A seleção apropriada do(s) organismo(s)-teste deve-se ao fato de que “os seres vivos respondem a todas as intervenções e perturbações diretas e indiretas, causadas por substâncias nocivas, com reações específicas em cada espécie.” (Knie, 1998)

A escolha do bioindicador se refere a sua representatividade no sistema e sua aplicabilidade e facilidade de manipulação dos ensaios (Harmel et al, 2006).

Dependendo da sua composição química, alguns efluentes são tóxicos apenas a bactérias, outros somente a microcrustáceos, ou apenas a espécies vegetais.

Segundo Knie (1998) como não existe nenhum organismo que seja igualmente sensível a todas as substâncias que podem potencialmente estar contidas na água, - mais de 11 milhões estão registradas junto ao Chemical Abstracts Service (CAS) - recorre-se a espécies dos diferentes níveis tróficos, às quais pertencem

genericamente representantes das bactérias, algas, microcrustáceos e peixes.

3.6 Teste de Toxicidade com *Daphnia magna*

A *D. magna* foi um dos organismos selecionados pela facilidade de cultivo e manutenção em laboratório. Além disso, apresenta reprodução ampla e frequente, atendendo as necessidades dos testes. Constitui um indicador representativo do ambiente aquático por estar no meio da cadeia trófica do mesmo.

Daphnia magna Straus, 1820 (Cladocera), um microcrustáceo planctônico de água doce, vulgarmente conhecido como pulga d'água.

Segundo Clare (2002) as fêmeas da espécie *Daphnia magna* podem atingir de 3 a 5mm. Sua média de vida é de 40 dias com temperaturas próximas a 25°C e 56 dias com temperaturas próximas a 20°C. A *Daphnia magna* tem uma ampla tolerância de temperatura, mas sua temperatura ótima é entre 18 e 22°C.



Figura 1- Morfologia *Daphnia magna*.

Fonte: www.idrc.ca/openebooks/147-7/ Modificado por Cristiane F. Fuzinato.

Segundo Brentano (2006) a *Daphnia magna* é amplamente utilizada internacionalmente e sua metodologia de cultivo e teste é normatizada em vários países. A *Daphnia magna* é um organismo facilmente cultivado e mantido em laboratório. Sua reprodução frequente garante a possibilidade de realização de testes constantes.

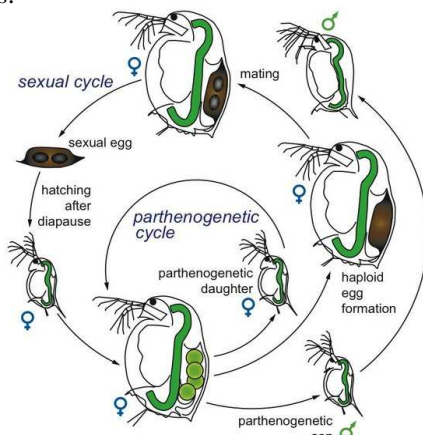


Figura 2– Ciclo reprodutivo *Daphnia magna*

Fonte: www.evolution.unibas.ch

3.6.1 Cultivo de *Daphnia magna*

O organismos-teste *D. magna*, utilizado nos testes de toxicidade aguda e crônica, são cultivados no Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX – ENS – UFSC, de acordo com a ISSO 6341 (1996) e DIN 38412 (1989).

Cerca de 30 organismos são cultivados em cada recipiente com capacidade de 2000ml e contendo aproximadamente 1500ml de meio de cultura M4, alimentados diariamente (exceto sábados e domingos) com cultura de *Scenedesmus subspicatus*, também produzida pelo LABTOX, conforme a ISSO 8692 (1986). São

cultivadas exclusivamente fêmeas, por serem geneticamente idênticas.

Os organismos são cultivados sob condições que permitam a avaliação da toxicidade das amostras, assegurando o controle da saúde e sensibilidade da população. O cultivo é realizado com temperatura controlada $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz) através da utilização de uma incubadora de DBO modificada.

A troca do meio de cultura e a limpeza dos recipientes são realizadas três vezes por semana. Já a alimentação dos organismos é feita diariamente, exceto sábados e domingos. Durante a manutenção dos lotes de cultivo são observadas a possível ocorrência de efípios, eliminação das carapaças e retirada dos filhotes.

Foram realizados testes de sensibilidade dos lotes de indivíduos, através do teste de sensibilidade com a substância de referência Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). De acordo com a ISO 6341 (ISO, 1996) a faixa aceitável para a sensibilidade de *D. magna* em relação ao Dicromato de Potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) deve estar entre 0,6 – 1,7 mg/L. A realização dos testes de sensibilidade garante a validação dos testes realizados conforme a ISO 6341 (ISO, 1996).

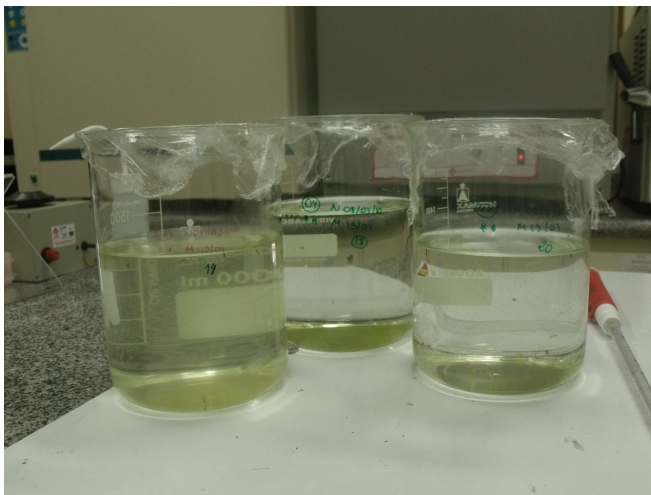


Figura 3– Cultivo de *Daphnia magna*
Fonte: acervo próprio

3.6.2 Testes de Sensibilidade com *Daphnia Magna*

Segundo Seco-Gordillo et al. (1998) a natureza do meio utilizado para os ensaios e as condições de cultivo são causas da obtenção de diferentes respostas de *D. Magna* a alguns metais pesados, entre eles o Dicromato de Potássio.

Para que os testes de toxicidade com *D. Magna* sejam validados é necessário que os organismos utilizados estejam dentro de uma faixa de sensibilidade, uma vez que as condições de cultivo influenciam no ciclo de vida destes organismos, podendo aumentar ou diminuir sua sensibilidade.

3.7 Teste de Toxicidade com *Vibrio fischeri*

As bactérias são microorganismos unicelulares, procariontes, microscópicos e se reproduzem por divisão celular simples.

A bactéria marinha luminescente *Vibrio fischeri* é considerada uma enterobactéria, em termos microbiológicos é gram negativa, anaeróbia facultativa e pertencente à família Vibrionaceae (Fuzinato, 2009).

A bactéria *Vibrio fischeri* tem uma distribuição global, principalmente em águas temperadas e subtropicais onde ocupa uma variedade de nichos. Todas as bactérias luminescentes são filogeneticamente agrupadas com enterobactérias. As que vivem em oceanos pertencem a três gêneros: *Vibrio*, *Photobacterium* e *Alteromonas* (Harmel, 2004).

Segundo Umbuzeiro e Rodrigues (2004) em 1979 Bulich desenvolveu um método para avaliar a toxicidade de efluentes industriais utilizando a bactéria *Vibrio fischeri*.

O teste de toxicidade com *Vibrio fischeri* se baseia na medida da luminescência, registrada em um aparelho denominado luminômetro. Durante seu metabolismo o microrganismo utiliza parte da energia obtida no ciclo de Krebs para emitir luz. Ao entrar em contato com substâncias tóxicas a produção de energia é inibida e as bactérias cessam ou diminuem a emissão de luz (Umbuzeiro e Rodrigues, 2004).

As bactérias luminescentes produzem luz quando elas simultaneamente oxidam riboflavina 5 – fosfato (FMNH₂) e um aldeído de cadeia longa (RCHO) como por exemplo, tetradecanal (C₁₄), na presença de oxigênio. A reação é catalizada por uma enzima do tipo flavina monooxigenase chamada luciferase (Harmel, 2004).

O teste com *Vibrio fischeri* é padronizado por normas internacionalmente aceitas como a alemã DIN 38412 L 34/341 e a ISO 11348. No Estado de São Paulo, é padronizado pela Norma Técnica CETESB L5.227, elaborada em 1987 e revisada em 2001. (Umbuzeiro e Rodrigues, 2004)

3.8 Teste de Toxicidade com Sementes de *Lactuca sativa*

A avaliação dos efeitos tóxicos de determinadas substâncias no meio terrestre tem sido feita através da realização de testes que se utilizam de organismos próprios deste meio. Dentre eles, podemos citar os testes de toxicidade com sementes de hortaliças, que consistem na exposição destas sementes à diluições da amostra e a posterior observação dos efeitos na germinação e no crescimento dos organismos-teste.

Segundo Barbero et al (2001) durante o período de germinação as sementes são sensíveis ao stress ambiental, que podem influenciar os primeiros estágios de desenvolvimento do organismo-teste. Parâmetros como sobrevivência, germinação e crescimento podem ser facilmente monitorados e avaliados. Segundo o mesmo autor, o metabolismo, o transporte de nutrientes e a divisão celular das sementes são fortemente influenciadas pelas condições do meio, podendo estes efeitos serem medidos através da observação destes parâmetros após a exposição das sementes a uma série de concentrações da amostra.

4. METODOLOGIA

Neste tópico serão apresentadas as metodologias de lixiviação da amostra, de cultivo de *Daphnia magna*, bem como os procedimentos experimentais para a realização dos ensaios de toxicidade propostos.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental e/ou no Laboratório Integrado de Meio Ambiente – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFSC.

4.1 Biodiesel de Soja produzido pela BIOPAR – Paraná

A BIOPAR – Bioenergia Paraná LDTA, localizada no município de Rolândia – PR produz 120.000 Kg/ dia de biodiesel, através de matérias primas como o

sebo bovino e o óleo degomado de soja, sendo este último produto, foco do trabalho em questão. A empresa ainda obtém como produto cerca de 13.600 Kg/d de glicerina bruta.

A BIOPAR possui autorização da ANP para comercialização do biodiesel desde fevereiro de 2009, com publicação da autorização em Diário Oficial da União em 19/02/2009 (DOU 19.2.2009)

Na BIOPAR a produção de biodiesel acontece em cinco principais etapas: Reação e Decantação/Separação, Destilação, Neutralização, Reação de transesterificação e por fim a retificação do álcool.

4.2 Amostragem do Biodiesel de Soja

A empresa BIOPAR forneceu, para fins científicos, 2 galões de 10 litros do biodiesel, produzido via rota metilica, a partir da soja, e armazenados no Laboratório de Toxicologia Ambiental/ ENS em temperatura ambiente, ao abrigo de luz.

4.3 Ensaios de Lixiviação

Para obtenção da fração solúvel do biodiesel de soja, foram utilizadas duas diferentes metodologias de lixiviação, com o objetivo de comparar os resultados obtidos, uma vez que não existe padronização para tal ensaio.

Em ambas as metodologias a amostra foi diluída na proporção 1:4 em solução de diluição específica para cada teste.

Para os testes de toxicidade com semestres de *L. sativa*, testes de toxicidade aguda com *D. magna* e testes de toxicidade aguda e crônica com *V. fischeri* o biodiesel de soja foi diluído em água destilada.

Já para os ensaios de toxicidade crônica com *D. Magna* foi utilizada solução de cultivo M4 como diluente.

4.3.1 Lixiviação com Homogeinizador

Através desta metodologia de lixiviação, a amostra diluída na proporção 1:4 foi lixiviada por um período de 24 horas, com uma rotação de 30rpm. Após este período, as amostras ficaram em repouso por 6 horas para estabilização e separação da fração solúvel do biodiesel de soja.

Para este procedimento de lixiviação foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador mecânico (homogeinizador)
- Frascos de lixiviação de vidro borossilicato
- Provetas para diluição do biodiesel na fração ¼.

Nestes ensaios de lixiviação os frascos contendo 50 ml de biodiesel e 150 ml de água de diluição foram devidamente tampados e vedados com fita PTFE para evitar vazamentos durante o ensaio. No agitador rotatório aplicou-se uma rotação de 30rpm, por 24 horas.

Após a lixiviação retirou-se o sobrenadante e armazenou-se a fração solúvel para posteriores utilizações nos ensaios de toxicidade. As amostras do lixiviado foram preservadas a 4°C em frascos de 10 ml, por um período de até 14 dias.

A fração solúvel obtida através desta metodologia será aqui denominada de FSA-A.

4.3.1 Lixiviação com Agitador Magnético

Nesta metodologia de lixiviação o biodiesel de soja foi também diluído na proporção ¼ e submetido à mistura através da rotação de um agitador magnético com rotação aproximada de 200rpm por um período de 24

horas. Após este período de agitação, as amostras ficaram em repouso por 6 horas e após este período, com a separação do diluente e do biodiesel de soja, foi possível retirar a fração solúvel.

Para este procedimento de lixiviação foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador magnético
- Bequer de 500ml
- Provetas para diluição do biodiesel na fração $\frac{1}{4}$.
- Peixinho (imã)

Nestes ensaios de lixiviação os bequeres contendo 50 ml de biodiesel e 150 ml de água de diluição foram cobertos com filme plástico. No agitador magnético aplicou-se uma rotação de aproximadamente 200 rpm.

Assim como na outra metodologia, após a lixiviação retirou-se o sobrenadante e armazenou-se a amostra para posteriores utilizações nos ensaios de toxicidade. As amostras do lixiviado foram preservadas a 4°C em frascos de 10 ml, por um período de até 14 dias.

A fração solúvel obtida através desta metodologia será aqui denominada de FSA-B.



Figura 4– Lixiviação com agitador magnético
Fonte: acervo próprio

4.4 Testes de Toxicidade Aguda

Estudos de Toxicidade Aguda visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso num curto período, de acordo com procedimentos protocolares. Geralmente trata-se da administração de uma única dose (ou concentração x tempo) (Azevedo & Chasin, 2003).

4.4.1 Teste de Sensibilidade com *Daphnia Magna*

Foram realizados testes de sensibilidade utilizando Solução de Dicromato de Potássio 10%.

Os testes foram realizados com 5 diferentes diluições: 0,5mg/L, 0,7 mg/L, 0,9 mg/L, 1,1 mg/L e 1,3 mg/L, em duplicata, além dos controles contendo apenas meio ISO. Para cada concentração foi observada a

imobilidade e/ou mortalidade do organismo teste. À partir destes dados calculou-se a CE50 (24hrs).

4.4.1 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia Magna*

Daphnia magna Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) é um microcrustáceo plantônico, consumidor primário na cadeia alimentar aquática, cuja alimentação se dá pela filtração do material orgânico particulado em suspensão. Em condições naturais, *D. magna* reproduz-se por partenogênese, originando numerosos descendentes geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras o que permite eliminar a variabilidade de ordem genética dos bioensaios. Seu ciclo de vida varia de 40 a 55 dias, podendo atingir 6mm.



Figura 5– *Daphnia magna*

Fonte: www.mblaquaculture.com

As amostras obtidas à partir da lixiviação do biodiesel de soja foram submetidas aos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, de acordo com que estabelece a NBR 12.713 (ABNT,2003). Os organismos-teste neonatos, com idade de 2 a 26 horas, foram expostos à diluições da amostra por um período de 48 horas.

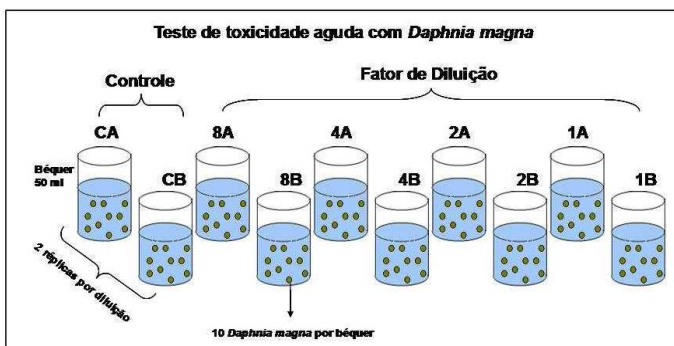


Figura 6– Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna*.

Fonte: Fuzinato, 2009.

Para cada teste foram preparadas diferentes diluições e um controle negativo com o meio para teste ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 1996). Após o preparo, a água de diluição ISO foi aerada por 24 horas para solubilização total dos sais, estabilização do pH e saturação do oxigênio dissolvido. Cada diluição foi distribuída em 2 béqueres (duplicata com 25ml da diluição em cada béquer), e foram expostos 10 organismos em cada béquer.

Os organismos foram dispostos sempre da menor para a maior concentração, iniciando pelo controle negativo. Foram utilizadas as concentrações de 12,50% (FD8), 6,25% (FD16), 4,16% (FD24) e 2,08% (FD48). Em alguns testes foi possível acrescentar outras concentrações da amostra, conforme consta nos resultados em anexo. Os testes foram mantidos em temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sem alimentação e sem iluminação.

Após 48h fez-se a contagem dos indivíduos imóveis em cada diluição e calculou-se a porcentagem de imobilidade por concentração. O resultado é expresso em CE 50 (Concentração de Efeito para 50% da população exposta), ou seja, concentração da amostra que causou

efeito agudo em 50% dos organismos expostos em 48h, nas condições de teste. No controle negativo a porcentagem máxima admitida de imobilidade é de 5%.

4.4.2 Testes de Toxicidade Aguda com *Vibrio fischeri*

O teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *V. fischeri* foi realizada por meio do aparelho Microtox® 500, que avalia a toxicidade através da medição da luminescência das bactérias, registradas pelo luminômetro, capaz de medir e registrar a quantidade de luz emitida pelas bactérias.

De acordo com ALMEIDA e LINS (2006), o método é aplicável para todos os tipos de efluentes líquidos, águas residuais com cor, substâncias químicas solúveis em água ou que nela possam ser dispersadas por meios químicos (solventes orgânicos) e/ou físicos (agitação mecânica, banho ultra-som), águas superficiais e lençóis freáticos.

Para os testes de toxicidade aguda com *V. fischeri* foi utilizado o aparelho MICROTOX, adquirido pelo Laboratório de Toxicologia-ENS/UFSC.



Figura 7– Aparelho Microtox

O teste de toxicidade foi realizado em temperatura controlada pelo equipamento, que mantém a série de diluições do teste em $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o reagente bacteriano em 3°C . A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias foi realizada em 3 momentos: antes de a bactéria entrar em contato com a amostra a ser testada, 15 e 30 minutos após o contato da bactéria com a amostra, sendo que 15 minutos é o tempo mais usual (FUZINATTO, 2009). As leituras foram realizadas automaticamente pelo equipamento, e armazenadas no mesmo.

A *V. fischeri* por se tratar de um organismo marinho, requer um ajuste da pressão osmótica das amostras, para que se obtenha amostras com 2% de salinidade, utilizando uma solução salina com concentração de 22% de NaCl (PETALA et al, 2005).

A porcentagem de inibição é calculada a cada concentração testada e depois com estes dados agrupados é possível calcular a concentração da solução testada que causou 50% de inibição a população de bactérias submetidas à amostra (ALMEIDA, 2006).

Para a validação dos testes é necessário que se realize, previamente, testes de sensibilidade dos lotes de bactérias, utilizando Sulfato de Zinco Heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$ 100 mg/L. A $\text{CE}_{50,15\text{min}}$ para o Sulfato de Zinco deve estar entre 3 e 10 mg/L.

4.4.3 Testes de Toxicidade Aguda com *L. sativa*

Os testes com espécie vegetal foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental –LabTox - ENS/UFSC a fim de se avaliar o possível efeito tóxico sobre a germinação e o crescimento da alface.

As sementes de *L. sativa* utilizadas no teste foram adquiridas no comércio comum, em pacotes de 1,2 gramas, da marca FELTRIN®, com pureza: 99,9%.

Antes de iniciar os testes foi realizada uma pré-seleção das sementes, através de visualização em lupa, descartando sementes com alterações (rupturas, alterações de cor, etc.). As sementes selecionadas foram então utilizadas no experimento, expondo as sementes à diferentes concentrações da amostra, realizando-se quatro diluições com cinco réplicas. Para o controle negativo utilizou-se água destilada.

Em placas de petri com diâmetro de 9 cm contendo três discos de papel filtro, foram dispostas 10 sementes de *Lactuca sativa* por placa, embebido com 4 ml da solução-teste.

De acordo com as recomendações da RAS (Regras para Análise de Sementes) as diluições das amostras (FSA-A e FSA-B) foram realizadas com água destilada, livre de impurezas orgânicas e inorgânicas.

Cada diluição com réplicas, totalizando 50 sementes por diluição. As placas foram envolvidas com papel pardo e mantidas em estufa com temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Todos estes procedimentos visam garantir a manutenção da aeração e umidade adequadas ao teste.

Após 7 dias da semeadura, para avaliação da germinação, fez-se a medição das raízes e quantificou-se as germinações por placa de petri.

Os testes com *L. sativa* não possuem padronização específica e portanto serão realizados seguindo orientações disponíveis nas Regras para Análise de Sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

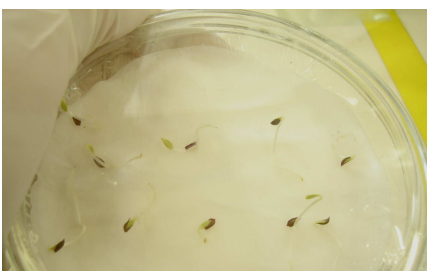
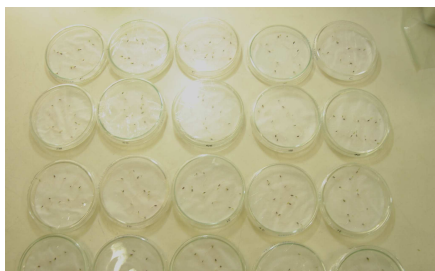


Figura 8– Teste de toxicidade com *Lactuca sativa*
Fonte: acervo próprio

4.5 Testes de Toxicidade Crônica

4.5.1 Testes de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna*

Para realização dos testes crônicos os organismos-teste foram expostos a várias diluições da fração solúvel do biodiesel de soja, pré-definidas pelo ensaio agudo, por um período de 21 dias.

Para a realização dos testes de toxicidade crônica utilizando *D. magna* como organismo-teste foram utilizados filhotes de daphnia com tempo de vida variando entre 2 a 26 horas de idade, expondo o organismo-teste, *D. magna*, a várias diluições de uma mesma amostra por um período de 21 dias.

Para cada teste foram utilizadas 4 diluições, além de um controle negativo, cujo meio é apenas o M4. As diluições também foram realizadas com meio M4.

Para definir as diluições utilizadas neste ensaio foram necessários testes prévios, de toxicidade aguda, para melhor escolha das diluições. Cada diluição foi colocada em béqueres de vidro de 50 mL contendo 25mL da solução-teste por béquer. Para cada diluição foi necessária a utilização de 10 béqueres de 50mL. Em cada diluição foi

adicionado um filhote de *D. magna*, totalizando 10 filhotes por diluição.

Os testes de toxicidade crônica com *D. magna* também mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, ou seja, temperatura ambiente controlada ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas de luz), sendo os organismos acompanhados diariamente, com anotações sobre número de jovens gerados e sobrevivência. A manutenção dos testes foi realizada 3 vezes por semana, nas segundas, quartas e sextas-feiras. Na manutenção é realizada a limpeza do bequer e a substituição da solução-teste antiga por uma nova solução.

Os parâmetros analisados durante o teste crônico foram: longevidade, fecundidade e crescimento. A longevidade é avaliada através do acompanhamento da sobrevivência dos organismos até o 21º dia de teste. A fecundidade é avaliada através do cálculo da média de filhotes por réplica. Já o crescimento foi avaliado através da variação de comprimento dos organismos testados, obtido pela medição dos organismos ao final dos 21 dias de teste com a utilização de uma lupa de aumento de 40 vezes e uma lâmina com escala milimetrada de 1 cm.

Os resultados para longevidade, fecundidade e crescimento obtidos nas diferentes diluições são comparados com o resultado obtido no controle. Desta forma pode-se determinar a concentração de efeito não-observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO). Os resultados foram analisados através de ferramentas de análise estatística de acordo com a recomendação da EPA 821-R-02-013.

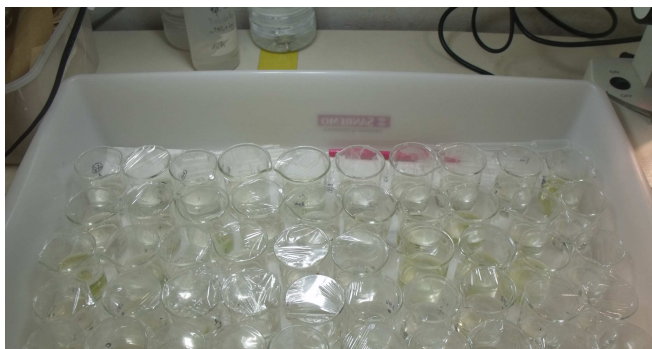


Figura 9– Teste de toxicidade crônica com *D. magna*
Fonte: acervo próprio

4.5.2 Testes de Toxicidade Crônica com *Vibrio fischeri*

Para realização dos testes crônicos foram seguidos os mesmos procedimentos descritos no teste de toxicidade aguda com *V. fischeri*, porém o tempo de leitura foi de 30 minutos.

5. RESULTADOS

5.1 Testes de Sensibilidade

5.1.1 Teste de Sensibilidade com *Daphnia magna*

Conforme descrito no capítulo anterior, foram realizados 04 testes de sensibilidade, cujos resultados são expressos nos quadros abaixo.

Quadro 1 – Resultados dos testes de sensibilidade

Sensibilidade - Dicromato de Potássio		
Lote	Data	CE50

185	03/04/2009	0,91
184	15/04/2009	0,81
3	26/04/2010	0,84
4	04/05/2010	1,06

Os resultados dos testes de sensibilidade indicam que os organismos utilizados nos testes estão dentro da faixa admissível de sensibilidade, que pode variar de 0,8 a 1,2, de acordo com a literatura. Assim, tanto os ensaios de toxicidade aguda quanto os ensaios de toxicidade crônica com *Daphnia magna* podem ser validados, uma vez que os valores da CE50 são aceitáveis.

5.1.2 Testes de Sensibilidade com *Vibrio fischeri*

O teste de sensibilidade do lote de bactérias *V. fischeri* foram realizados com Sulfato de Zinco e resultou em uma CE50 de 4,051 mg/L. Desta forma o teste pôde ser validado, uma vez que o valor de sensibilidade para este ensaio deve estar compreendido entre 2 e 10 mg/L.

5.2 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna*

Foram realizados dois testes toxicológicos agudos preliminares para *D. magna* (12,5, 50,0 e 100,0%) com o intuito de definir as concentrações mais adequadas à substância.

Os resultados destes testes preliminares foram semelhantes, nos quais houve a mortandade de quase 100% dos indivíduos testados nas três diferentes concentrações, indicando a necessidade de realizar testes a exposição dos organismos à concentrações ainda menores da fração solúvel do biodiesel de soja.

Desta forma, posteriormente aos testes preliminares, foram realizados quatro testes agudos para

cada amostra (FSA-A e FSA-B) com as diluições de 2,08%, 3,12%, 4,16%, 6,25%, 8,33% e 12,5% da fração solúvel em água do biodiesel de soja.

5.2.1 Resultados de Toxicidade Aguda para Fração Solúvel em Água A – FSA-A

Os resultados dos testes de toxicidade aguda, apresentados como CE50 (concentração que causa efeito em 50% da população exposta) são apresentados no Quadro abaixo. A ficha de teste completa é apresentada sob forma de tabela em anexo.

Quadro 2 – Resultados dos testes agudos com *D. magna*

Resultados - Toxicidade Aguda		
Teste	Data	CE50
01	18/02/09	7,73
02	25/03/09	12,50
03	01/04/09	5,99
04	01/04/09	5,46

Os resultados mostram que a concentração média de 6,29% da amostra lixiviada, poderá causar efeito letal para 50% dos organismos.

5.2.2 Resultados de Toxicidade Aguda para Fração Solúvel em Água A – FSA-B

Os resultados obtidos através dos testes de toxicidade aguda com *D. Magna* indicam que a concentração média de 8,68% da amostra lixiviada FSA-B poderá causar efeito letal para 50% dos organismos.

Quadro 3 – Resultados dos testes agudos com *D. magna*

Resultados - Toxicidade Aguda		
Lote	Data	CE50
01	24/05/10	7,215

02	25/05/10	Não calculada
03	01/06/10	10,50
04	08/06/10	8,33

Sendo a *D. magna* um microcrustáceo representante da fase intermediária da cadeia alimentar no meio aquático, este fato poderá causar um importante desequilíbrio ecológico no ambiente contaminado pela FSA de biodiesel de soja.

Os ensaios de toxicidade aguda também demonstraram que tanto a FSA-A quanto a FSA-B do biodiesel de soja, ou seja, amostras obtidas através de duas metodologias distintas, são extremamente tóxicas, apresentando uma CE50 média de 6,29% 8,68% respectivamente.

5.3 Testes de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna*

À partir dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda, pode-se estabelecer as concentrações utilizadas nos testes de toxicidade crônica. Foram utilizadas as seguintes diluições: 1,96%, 1,04%, 0,78% e 0,52%). Para que os resultados pudessem ser interpretados e avaliados, um grupo controle também foi mantido durante o teste, sendo os organismos expostos apenas ao meio de cultivo M4.

Os testes de toxicidade crônica visam avaliar as possíveis alterações em três diferentes parâmetros: longevidade, reprodução e crescimento.

Desta forma, avaliou-se os resultados obtidos para estes parâmetros, após 21 dias de teste, através do software Dunnet.

5.3.1 Resultados de Toxicidade Cronica para Fração Solúvel em Água A – FSA-A

Após os 21 dias de exposição dos microcrustáceos *Daphnia magna* à quatro diferentes diluições da Fração Solúvel do Biodiesel de Soja FSA-A obteve-se os dados constantes em anexo.

Através dos resultados, pode-se observar que a amostra apresentou efeito tóxico crônico para os três diferentes parâmetros, em determinadas concentrações.

Observou-se um decréscimo da longevidade dos organismos testados à medida em que as concentrações aumentavam.

Para a maior concentração da amostra (Fator de Diluição FD 64), após os 21 dias de teste, apenas 3 dos 10 indivíduos expostos encontravam-se vivos.

No entanto, a menor concentração que pode ser observado efeito tóxico (CEO – Concentração de Efeito Observado) foi a FD 96 diluição com 1,04% de amostra de FSA-A de biodiesel de soja. Já a CENO (Concentração de Efeito Não Observado) determinada para este teste foi 0,78%.

Na Figura 100 são mostrados o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos *D. magna* ao final dos 21 dias de teste.

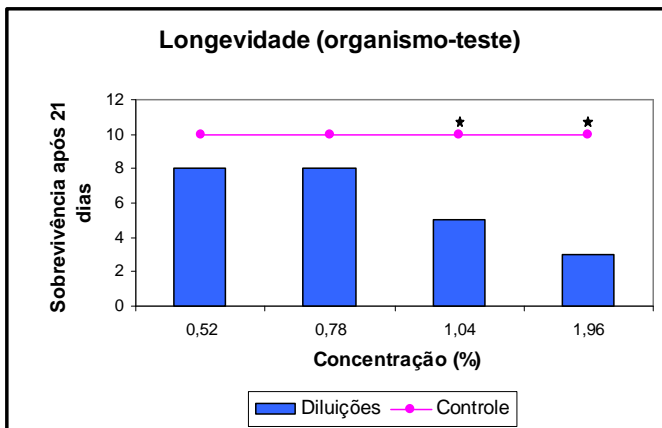


Figura 10 - Longevidade para *D. magna*

* a média de sobrevivência para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunnnett.

Já para o parâmetro crescimento pode-se observar efeitos de toxicidade crônica nas quatro diferentes diluições. Para este parâmetro a CEO encontrada foi de 0,52%. Já a CENO não pode ser determinada, uma vez que observou-se efeito de toxicidade em todas as diluições testadas, impossibilitando o cálculo da CENO, o que indica que o efeito não observado se dá em concentrações inferiores à 0,52%.

Os maiores efeitos de impedimento negativo no desenvolvimento do microcrustáceo foi observado nas concentrações mais altas. De acordo com a literatura, o comprimento de uma *D. magna* adulta é de aproximadamente 5mm. Verificou-se ao final do teste que o comprimento de grande parte dos organismos expostos às maiores concentrações ficou em torno de 3mm.

Abaixo na figura 11, é possível a observação das médias dos tamanhos dos organismos em todas as concentrações e a média do controle, possibilitando um comparativo.

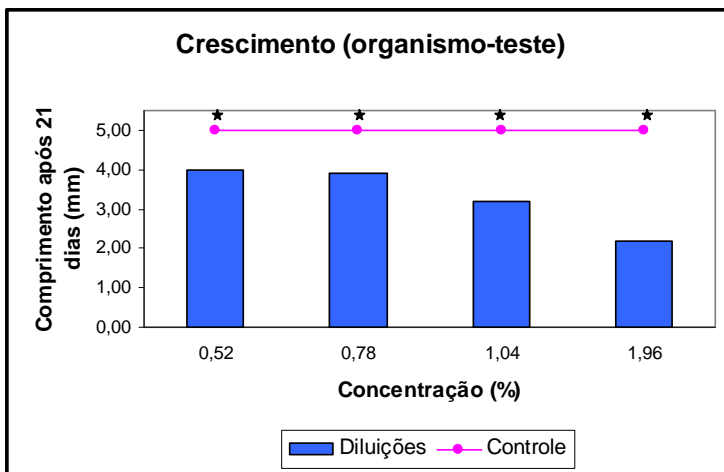


Figura 11- Crescimento para *D. magna* ao fim dos 21 dias de teste da toxicidade crônica.

* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste t com ajuste de Bonferroni.

Para o terceiro parâmetro avaliado, reprodução, também verificou-se a ocorrência de efeito tóxico crônico, porém apenas para o fator de diluição FD 64 (1,96%), onde a média de filhotes por postura foi de apenas 3,25 indivíduos. Desta forma, o CEO encontrado para este parâmetro foi de 1,96% e a CENO 1,04%. Todos os organismos testados reproduziram, tendo cada organismo pelo menos 2 posturas.

A figura 12 mostra a média de filhotes por postura dos indivíduos durante o teste de toxicidade crônica para amostras de biodiesel FSA-A.

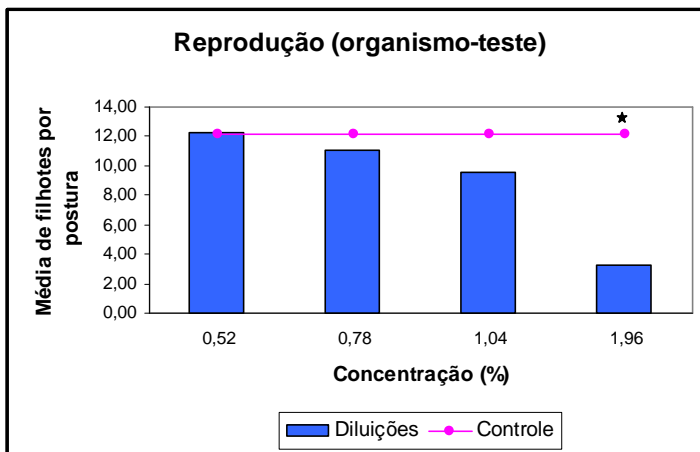


Figura 12: Reprodução para *D. magna* após 21 dias de teste de toxicidade crônica.

* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste t com ajuste de Bonferroni.

Á partir da análise individual dos parâmetros anteriormente descritos no teste de toxicidade crônica, pode-se observar que a amostra de FSA-A de biodiesel de soja apresenta um potencial tóxico crônico sobre os organismos-teste *D. Magna*, indicados sob a forma de CEO e CENO, conforme quadro abaixo.

Quadro 4 - Resultados do teste crônico - Amostra FSA-A

Teste de Toxicidade Crônica para a FSA-A de Biodiesel de Soja		
	CEO (%)	CENO (%)
Longevidade	1,04	0,78
Crescimento	0,52	>1,96
Reprodução	1,96	1,04

Outro parâmetro avaliado foi a ocorrência de alterações morfológicas nos organismos-teste, sendo este apenas um parâmetro qualitativo e avaliado ao final dos 21 dias de teste através de visualizações em Lupa invertida com aumento de até 10x.

Foram identificadas apenas 3 alterações morfológicas dentre os 50 organismos testados, sendo 2 deles em organismos do FD 192 e 1 do FD 64.

As alterações podem ser observadas na figura 13, onde as duas primeiras imagens referem-se a organismos do FD 192 e a última do FD 64.

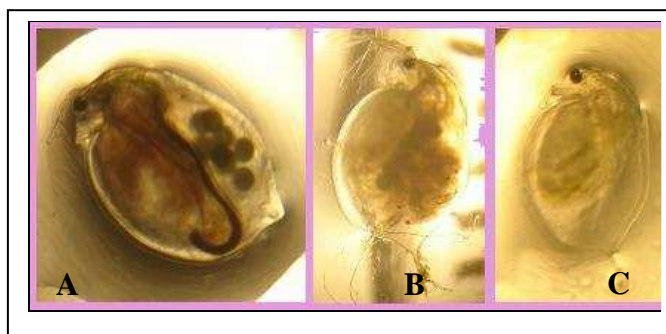


Figura 13: Alterações morfológicas observadas. Organismo A sem espinho apical, organismo B com tubo digestivo interrompido e organismo C com deformação no dorso.

Fonte: acervo próprio

No organismo-teste A (FD 192) observa-se o encurtamento do espinho apical , O organismo B (FD 192) apresenta interrupção do tubo digestivo e o organismo C (FD64) apresenta coloração diferenciada.

5.3.1 Resultados de Toxicidade Crônica para Fração Solúvel em Água A – FSA-B

Assim como o teste realizado com o FSA-A, após os 21 dias de exposição dos microcrustáceos *Daphnia magna* à quatro diferentes diluições da Fração Solúvel do Biodiesel de Soja FSA-A obteve-se os dados constantes em anexo.

Através dos resultados, pode-se observar que a amostra apresentou efeito tóxico crônico para os três diferentes parâmetros, em determinadas concentrações.

Ao contrario do teste crônico com a FSA-A, para o FSA-B não observou-se um descréscimo significativo da longevidade dos organismos testados à medida em que as concentrações aumentavam, ou seja não foi possível verificar um efeito linear.

Para a maior concentração da amostra (Fator de Diluição FD 64), após os 21 dias de teste, 9 dos 10 indivíduos expostos encontravam-se vivos.

Para concentração de 0,78% (FD 128) observou-se o menor número de organismos vivos ao final dos 21 dias, sendo esta a concentração considerada como CEO, ou seja, a concentração em que se observou efeito tóxico. Ao contrário do que se espera, concentrações maiores como FD 96 e FD 64 não apresentaram efeito tóxico para este parâmetro.

Na Figura 104 são mostrados o desenvolvimento e a sobrevivência dos organismos *D. magna* ao final dos 21 dias de teste.

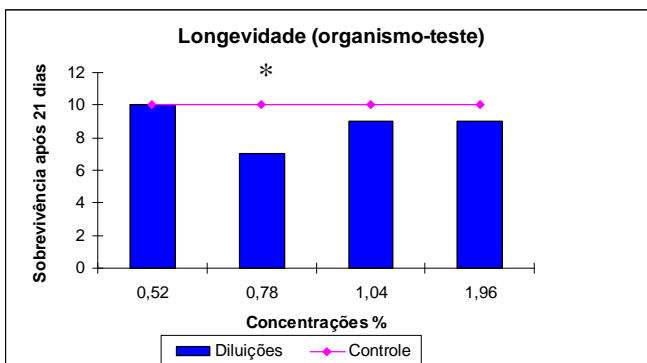


Figura 14 - Longevidade para *D. magna*

* a média de sobrevivência para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste de Dunnett.

Assim como observado no teste crônico com a FSA-A, para o parâmetro crescimento pode-se observar efeitos de toxicidade crônica nas quatro diferentes diluições. Para este parâmetro a CEO encontrada foi de 0,52%. Já a CENO não pode ser determinada, uma vez que observou-se efeito de toxicidade em todas as diluições, impossibilitando o cálculo da CENO, o que indica que o efeito não observado se dá em concentrações inferiores à 0,52%.

Os efeitos de impedimento negativo no desenvolvimento do microcrustáceo foi observado em todas as concentrações, uma vez que o comprimento médio dos organismos expostos à maior concentração ficou em torno de 4,0 mm.

Na figura 15, é possível a observação das médias dos tamanhos dos organismos em todas as concentrações, juntamente com a média do controle, onde se pode fazer uma comparação.

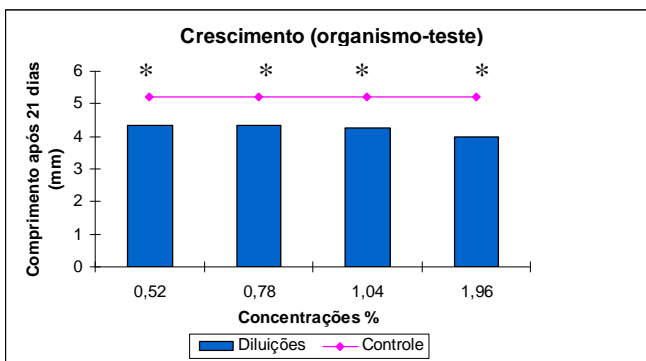


Figura 15 - Crescimento para *D. magna* ao fim dos 21 dias de teste da toxicidade crônica.

*) a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste t com ajuste de Bonferroni.

Para o terceiro parâmetro avaliado, reprodução, a CEO encontrada foi de 1,96% e a CENO 1,04%. Todos os organismos testados reproduziram, tendo cada organismo pelo menos 4 posturas, exceto um dos organismos identificado como macho, descrito a seguir.

A figura 16 mostra a média de filhotes por postura dos indivíduos durante o teste de toxicidade crônica para amostras de biodiesel FSA-B.

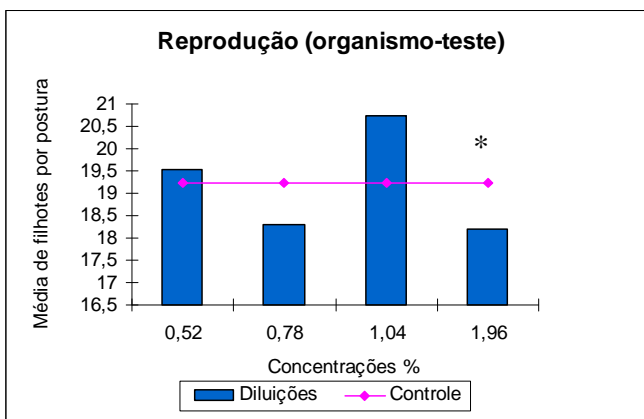


Figura 16: Reprodução para *D. magna* após 21 dias de teste de toxicidade crônica.

* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $\alpha = 0.05$ em um teste t com ajuste de Bonferroni.

Á partir da análise individual dos parâmetros anteriormente descritos no teste de toxicidade crônica, pode-se observar que a amostra de FSA-B de biodiesel de soja apresenta um potencial tóxico crônico sobre os organismos-teste *D. Magna*, indicados sob a forma de CEO e CENO, conforme quadro a seguir.

Quadro 5 - Resultados do teste crônico - Amostra FSA-B

Teste de Toxicidade Crônica para a FSA-B de Biodiesel de Soja		
	CEO (%)	CENO (%)
Longevidade	1,04	0,52
Crescimento	0,52	>1,96
Reprodução	1,96	1,04

Outro parâmetro avaliado foi a ocorrência de alterações morfológicas nos organismos-teste, sendo este apenas um parâmetro qualitativo e avaliado ao final dos 21 dias de teste através de visualizações em Lupa invertida com aumento de até 10x.

Foram identificadas apenas 2 alterações morfológicas dentre os 50 organismos testados, sendo ambos em organismos do FD 96.

As alterações podem ser observadas na figura abaixo.

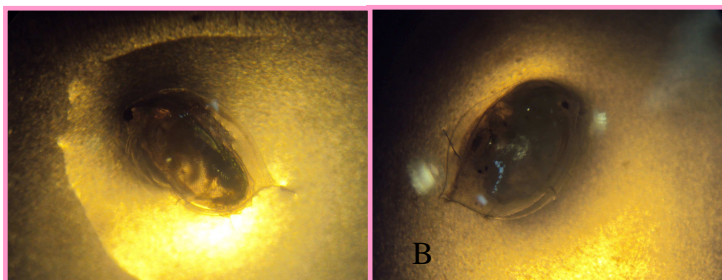


Figura 17: Alterações morfológicas observadas. Organismo A identificado como macho e organismo B sem antes.

Fonte: acervo próprio

O organismo-teste A (FD 96) foi identificado como um macho, pela sua características morfológicas. O organismo B (FD96), cuja morte foi registrada no último dia de teste, não possui antenas.

Os valores encontrados para CEO foram os mesmos para as duas amostras, FSA-A e FSA-B, indicando um potencial tóxico semelhante, apesar de obtidas por metodologias distintas.

5.4 Testes de Toxicidade com *Vibrio fischeri*

Devido à disponibilidade do equipamento Microtox, específico para o teste de toxicidade com bactérias

luminescentes, só foi possível realizar este teste de toxicidade para a amostra FSA-B.

A amostra FSA-B foi testada uma única vez, avaliando-se a luminescência das bactérias após um período de exposição de 15 e 30 minutos.

O valor obtido da concentração que causa efeito em 50% da população exposta CE50 em 15 minutos foi de 6,519 mg/L e para 30 minutos 5,315 mg/L.

Dessa forma, conclui-se que a fração solúvel de biodiesel de soja (FSA-B) possui efeito tóxico para estes organismos-teste.

5.5 Testes de Toxicidade com *Lactuca sativa*

5.5.1 Resultados para Fração Solúvel em Água A – FSA-A

Para o teste de toxicidade com *L. sativa* foram avaliados dois parâmetros: germinação e crescimento.

Após 7 dias de exposição das sementes à um substrato contendo 3 diferentes diluições da amostra FSA-A realizou-se a medição das radículas e quantificou-se o número de sementes germinadas. O quadro 6 apresenta os resultados obtidos.

Para o critério germinação não foi observado efeito tóxico, uma vez que o número de sementes germinadas não teve alteração significativa se comparada ao controle negativo.

Já para o critério crescimento pode-se observar um efeito tóxico em todas as concentrações da amostra.

**Quadro 6 - Resultados do teste com semente de *L. sativa* -
Amostra FSA-A**

Amostra FSA-A					
Comprimento da raiz		Controle Negativo	FD 4	FD16	FD 48
A	1	3,2	1,5	2,4	2,2
	2	2,8	1,5	2,3	2,5
	3	2,5	2	2,3	1,9
	4	2,6	2,5	2	2,1
	5	2,3	2,5	2,6	2
	6	2,5	1	2,1	2,5
	7	2,8	0,8	1,9	1,9
	8	2,3	1	2,1	2,3
	9	2,2	2,1	0,7	2,3
	10	-	2	2	2,1
B	11	2,1	1,5	2,3	2,4
	12	2,7	1,9	2	1,8
	13	2,4	1,6	1,9	2,1
	14	2,8	1	1,8	2,1
	15	2,4	2,2	2,1	2,6
	16	2,2	1,7	2,3	1,8
	17	2,3	1,8	2	2,1
	18	2,5	1,2	1,7	2
	19	2,3	1,5	1,6	2,1
	20	2,2	1,4	2,3	1,7
C	21	3,3	1,5	1,5	2,1
	22	2,5	1,8	2,6	2
	23	2,8	0,5	2,2	2,9
	24	2,7	1,5	2,6	2
	25	2,9	2	2,1	2,1
	26	2,4	2,1	2,1	2,1
	27	2,3	1,6	2,2	1,4
	28	2	1,1	2,4	2,1
	29	3	1,8	1,7	2,3
	30	-	1,8	2,1	1,9
D	31	2	1,5	2,4	2,3
	32	1,9	1,6	2,6	1,6
	33	2,7	0,7	2,5	1,9
	34	2,3	1,5	2,3	2
	35	2,6	1,8	0,6	2,5
	36	2	1,9	2	1,6
	37	2,4	1,9	2,2	1,8
	38	2,3	1	1,8	1,8
	39	2,8	0,5	2,5	-
	40	2,7	1,8	2,3	-
E	41	2,2	2	2,4	2,2
	42	3,3	1,9	1,4	2,5
	43	2,3	2,2	2	2,3
	44	2,2	2,1	1,8	2,6
	45	2,4	2	2,5	2
	46	2,2	2	2,5	2,1
	47	2	1,8	1,5	2,1
	48	2	1,2	1,3	2,4
	49	2,2	1,8	1,7	1,2
	50	0,5	1	-	-
Comprimento Total		116	80,6	100,2	98,3
Núm. de Germinadas		48	50	49	47
Comprimento Médio		2,416666667	1,612	2,044898	2,091489
% variação de cresc.			-33,29655	-15,38353	-13,45561
% variação de germ.			4,166667	2,083333	-2,083333

5.5.2 Resultados para Fração Solúvel em Água A – FSA-B

Da mesma forma que se realizou o teste com a amostra FSA-A, após 7 dias de exposição das sementes à um substrato contendo 3 diferentes diluições da amostra FSA-B realizou-se a medição das radículas e quantificou-se o número de sementes germinadas. O quadro 7 apresenta os resultados obtidos.

Para o critério germinação não foi observado efeito tóxico, uma vez que o número de sementes germinadas não teve alteração significativa se comparada ao controle negativo.

Já para o critério crescimento pode-se observar um efeito tóxico em todas as concentrações da amostra.

Quadro 7 - Resultados do teste com semente *L. sativa* - Amostra FSA-B

Amostra FSA-B					
Comprimento da raiz		Controle Negativo	FD 4	FD16	FD 48
A	1	3,4	2,9	2,8	4
	2	2,7	2,7	2,4	2,5
	3	3,2	2,6	2,8	2,7
	4	2,7	2,7	2,5	3,4
	5	2,9	2,4	2,7	3,2
	6	2,5	0,7	2,4	2,1
	7	2,8	0,3	2	3,3
	8	3	0,8	2,7	2,5
	9	2,9	0,2	2,9	2,3
	10	1,5	0,4	2,8	2,5
B	11	2,9	3,3	2,8	3,4
	12	3,3	3,1	3,2	2,7
	13	3	3	2,9	2,6
	14	2,5	2,8	2,5	2,7
	15	2	2,9	2,5	2,5
	16	2,6	3,5	2,3	3,3
	17	2,9	0,6	2,6	2,3
	18	2,5	1	2,5	2,1
	19	3	2,6	3,3	2,5
	20	2,6	-	2,5	2,9
C	21	3,1	2,4	2,7	2,9
	22	2,9	3,2	3,3	2,8
	23	3,7	2,5	2,2	2,9
	24	2,3	2,4	2,3	2,7
	25	3,5	2,3	2,7	3,5
	26	2,5	2,9	2,8	2,6
	27	2,9	0,9	3	3
	28	2,8	1,7	1,9	2,5
	29	2	0,8	0,5	1,9
	30	2,2	1,3	1,8	-
D	31	2,6	2,5	3	2,7
	32	2,1	2,7	2,8	2,9
	33	2,3	2,5	2,6	2,2
	34	2,5	2,8	2,1	1,9
	35	3,1	2,4	2,9	3,1
	36	2,4	0,6	3	3,7
	37	3	2	2	2,3
	38	3,4	2,6	2,2	3,1
	39	3,1	3,2	0,6	2,9
	40	3,2	1,8	1,6	2,5
E	41	3	2,9	2,6	2
	42	3,4	2,2	1,9	3
	43	2,4	2,6	2,5	2,6
	44	3,4	2,8	2,8	2,5
	45	2,9	2,2	2,5	2,3
	46	3,3	2,4	2	2,8
	47	3,5	2,1	0,4	2,1
	48	2,1	2,2	0,6	2,7
	49	2,2	0,3	1,2	1,8
	50	2,3	0,5	2,8	-
Comprimento Total		139	102,2	118,4	129,4
Núm. de Germinadas		48	50	49	47
Comprimento Médio		2,895833333	2,044	2,416327	2,753191
% variação de cresc.			-29,41583	-16,55851	-4,925762
% variação de germ.			4,166667	2,083333	-2,083333

Os comportamentos observados no teste para as amostras FSA-A e FSA-B foram semelhantes, portanto ambas as amostras apresentaram efeitos tóxicos para a *Lactuca sativa*.

6. CONCLUSÃO

À partir dos testes e avaliações toxicológicas desenvolvidas neste trabalho, pode-se concluir que:

- as metodologias de obtenção da FSA originaram amostras semelhantes, uma vez que os resultados dos testes toxicológicos apresentaram valores próximos;
- a fração solúvel do biodiesel de soja, tanto FSA-A quanto FSA-B, são tóxicos para os organismos-teste utilizados, *D. magna*, *L. sativa* e *V. fischeri*;
- as amostras apresentaram efeito agudo para *D. magna* (FSA-A = **6,29%** e FSA-B = **8,68%**);
- A amostra FSA-B apresentou efeito agudo para *V. fischeri* (**6,52%**);
- as amostras apresentaram efeito crônico para o organismo-teste *D. magna* em todos os parâmetros avaliados com registro de alterações morfológicas;
- a amostra FSA-B apresentou efeito crônico para *V. fischeri* com redução da luminescência;
- as amostras apresentaram efeito crônico para *L. Sativa* no parâmetro crescimento.
- Não se observou efeito crônico para *L. Sativa* no parâmetro germinação.

7. RECOMENDAÇÕES

Através dos estudos e ensaios realizados pode-se apontar as seguintes necessidades/deficiências:

- Padronização de uma metodologia de obtenção da fração solúvel de biocombustíveis, com definição de técnica de lixiviação e proporção água/biocombustível.

- Padronização de testes de toxicidade utilizando sementes como organismos-teste.

- Normalização de testes de toxicidade para biocombustíveis, indicando organismos-teste mais indicados.

- Realização de testes com outros organismos-teste para avaliar a toxicidade e os potenciais riscos ecológicos para outros ambientes e/ou níveis tróficos.

- Realização de ensaios de mutagenicidade, para avaliar possíveis efeitos mutagênicos desta substância.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.; LINS, G.A. **Determinação de toxicidade aguda de efluentes com bactérias marinhas – *Vibrio fischeri*. Relatório Técnico.** Disponível em: www.upav-valoracion.org/pags/eventos/cobreap/art10.pdf. Acessado em 12/06/2009.

BARBERO, P.; BELTRAMI, M.; BAUDO, R.; ROSSI, D. **Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment.** J. Limnol. v.60, n.2, p269-276, 2001.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** Florianópolis – SC. 130p. Dissertação (mestre em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

BÜCKER, A., CARVALHO, W., ALVES-GOMEA, J.A. **Avaliação da mutagênes e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno.** Revista ACTA Amazônica. v. 36 (3). p. 357:364, 2006

CARVALHO PINTO-SILVA, C.R. **Incidência de fitoplankton tóxico na costa Catarinense: impacto na saúde pública e no meio ambiente.** Dissertação (doutorando em Engenharia Ambiental). UFSC, Florianópolis, 2005.

CHASIN, A. A. da M.; AZEVEDO, F. A. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos: RIMA, 2003.

CHASIN, A A M.; PEDROZO, M.F.M. O estudo da toxicologia. In: AZEVEDO, F.A; CHASIN, A . A . M. (Coord.) **As Bases Ecotoxicológicas da Ecotoxicologia**. São Paulo: RiMa, 2003.

CLARE, J. **Daphnia: An Aquarist's Guide**. Disponível em: <http://www.caudata.org/daphnia/> Julho 2002. Acesso em 13/06/2009

FUZINATTO, Cristiane Funghetto. **Avaliação da Qualidade da Água de Rios localizados na Ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o Índice de Qualidade de Água**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 257 pgs.

GBERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; ARAÚJO, R.P.A. & RAMOS, M.L.L.C. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo. CETESB. Série manuais. V6. 1990.

GERIS, R. **Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica**. Quím. Nova vol.30 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2007. ISSN 0100- 4042.

GERPEN, J.V., KNOTHEM, G., KRAHL, J., RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise da qualidade de águas superficiais**. Blumenau-SC, 100p. Dissertação (mestre em Engenharia

Ambiental) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, 2004.

HARMEL, V. C, SAAR, J.H., PINHEIRO, A. **Considerações Relevantes sobre a Busca da Padronização de um Teste de Biotoxicidade Crônica com *Vibrio fischeri* e Implantação de Teste de Toxicidade Crônica com *Daphnia Magna*.** Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC - Julho/2006.

KNIE, J.L.W; LOPES, E.W.B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KNIE, J. **Proteção Ambiental com Testes Ecotoxicológicos.** Disponível em www.fatma.sc.gov.br. Florianópolis, 1998.

KNOTHEM, G., GERPEN, J.V, KRAHL, J., RAMOS, L.P. **Manual do Biodiesel.** Tradução: Luiz Pereirs Ramos. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

LAITANO, K.S.; MATIAS, W.G. **Testes de Toxicidade com *Daphnia Magna*: Uma ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB.** Jornal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. V.1. N 1 2006.

LANZER, R; MULLER, M. **Comparação de Testes Ecotoxicológicos com *Biomphalaria tenagophila* e *Daphnia Magna* Utilizando Remazol Brilliant Blue R e Água de Arroio Urbano.** Jornal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. V.2. N 1 2007.

LEGISLAÇÃO FEDERAL -
www.presidencia.gov.br/legislacao - acessado em [30/03/2009](http://www.presidencia.gov.br/legislacao).

MACHADO, V.G. **Determinação do Potencial Tóxico e Genotóxico de Líquido Percolado gerado em Aterramento Sanitário de Resíduos Sólidos Urbanos.** Dissertação programa PPGA. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.

MATIAS, W.G. Material de aula: **Apostila do curso de Toxicologia Ambiental.** Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 2009.

NETO, P.R.C., ROSSI, L.F.S. **Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação do óleo de soja usado em frituras.** Departamentos de Química e de Mecânica do Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná (CEFET-PR) - Curitiba - PR

PETALA, M., TSIRIDIS, V., KYRIAZIS, P., SAMARAS, A., KUNGOLOS, A., SAKELLAROPOULUS, G.P. **Evaluation of toxic response of heavy metals and organic pollutants using MICROTOX acute toxicity test.** Proceedings of the 9th International Conference on Environmental Science and Technology, Greece, 2005.

PORTAL DO BIODIESEL – Disponível em: www.biodieselbr.com acessado em 01/04/2009

RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F; MARQUES, E.K. **Mutagenese Ambiental.** Canoas: Ed. ULBRA,2003.

SECO GORDILLO, J.C., FERNANDEZ PEREIRA, J.F., VALE PARAPAR. **Evaluación de la ecotoxicidad aguda de metales pesados con *Daphnia magna* Straus.** Ecotoxicology and Environmental, 52: 3-12.

SETAC - Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia – Disponível em: <http://setacbrasil.org.br/> acessado em 30/03/2009.

UMBUZEIRO, G. de A.; ROGRIGUES, P. F. **O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o Controle da Poluição.** Informativo técnico. Ambiente técnico – CRF/CETESB ano 4 no 007, junho, 2004.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** Editora Rima. São Carlos. 2006.

9. ANEXO

9.1 Testes de Sensibilidade com *Daphnia magna*

Teste 01

- Data do teste: 03/04/2009.
- Lote testado: 185 (controle de cultivo).
- Início do teste: 9:15h.
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 8 – Resultados dos Testes de Sensibilidade – Lote 185

Concentração K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg/L)	Organismos Imóveis	
	24h (A)	24h (B)
Controle	0	0
0,5	0	0
0,7	0	0
0,9	5	4
1,1	9	10
1,3	10	10
CE(50) = 0,9071		

Teste 02

- Data do teste: 15/04/2009.
- Lote testado: 184 (controle de cultivo).
- Início do teste: 16:15h.
- Número de organismos por concentração: 5 por réplica.

Quadro 9 – Resultados dos Testes de Sensibilidade – Lote 184

Concentração K2Cr2O7 (mg/L)	Organismos Imóveis	
	24h (A)	24h (B)
Controle	0	0
0,5	0	0
0,7	3	2
0,9	4	4
1,1	4	4
1,3	5	5

CE(50) = 0,812

Teste 03

- Data do teste: 26/04/2010.
- Lote testado: 04 (controle de cultivo).
- Início do teste: 10:30h.
- Número de organismos por concentração: 05 por réplica.

Quadro 10 – Resultados do Teste de Sensibilidade – Lote 04

Concentração K2Cr2O7 (mg/L)	Organismos Imóveis	
	24h (A)	24h (B)
Controle	0	0
0,5	0	0
0,7	0	0
0,9	0	2
1,1	2	4
1,3	3	5

CE(50) = 1,057

Teste 04

- Data do teste: 04/05/2010.
- Lote testado: 03 (controle de cultivo).
- Início do teste: 10:45h.
- Número de organismos por concentração: 5 por réplica.
-

Quadro 11 – Resultado dos Teste de Sensibilidade – Lote 03

Concentração	Organismos Imóveis	
	24h (A)	24h (B)
K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg/L)		
Controle	0	0
0,5	0	0
0,7	2	4
0,9	2	2
1,1	2	4
1,3	5	3
CE(50) = 0,84		

9.2 Testes de Toxicidade Aguda com *D. Magna*

9.2.1 Resultados para Amostra FSA-A

Teste 01

- Data do teste: 18/02/2009.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja (lixiviação ¼)
- Início do teste: 10:30h.
- pH = 6,52
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 12 – Resultados do Teste Agudo – FSA-A

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	8	7
12	8,33%	8	5
16	6,25%	3	2
24	4,16%	1	2
32	3,12%	1	0
48	2,08%	0	0

- $CE(50) = 7,73$

Teste 02

- Data do teste: 25/03/2009.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja (lixiviação ¼)
- Início do teste: 9:30h.
- pH = 6,30
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 13 – Resultados do Teste Agudo – FSA-A

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	3	7
12	8,33%	0	0
16	6,25%	3	3
24	4,16%	5	4
32	3,12%	0	0
48	2,08%	2	0

- $CE(50) = 12,50$
- Obs.: Formação de “plumas” aderidas na carapaça.

Teste 03

- Data do teste: 01/04/2009.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja (lixiviação $\frac{1}{4}$) - Filtrada
- Início do teste: 15:15 h.
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 14 – Resultados do Teste Agudo – FSA-A

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	10	10
12	8,33%	8	8
16	6,25%	3	5
24	4,16%	3	4
32	3,12%	2	2
48	2,08%	4	2

- $CE(50) = 5,99$

Teste 04

- Data do teste: 01/04/2009.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja (lixiviação $\frac{1}{4}$)
- Início do teste: 15:15 h.
- Número de organismos por concentração: 5 por réplica.

Quadro 15 – Resultados do Teste Agudo – FSA-A

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	5	5
12	8,33%	5	3
16	6,25%	2	2
24	4,16%	3	1
32	3,12%	1	1
48	2,08%	0	0

- $CE(50) = 5,46$

9.2.2 Resultados para Amostra FSA-B

Teste 01

- Data do teste: 24/05/2010.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja FSA-B (lixiviação 1/4)
- Início do teste: 10:15h.
- Número de organismos por concentração: 5 por réplica.

Quadro 16 – Resultados do Teste Agudo – FSA-A

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	5	1
12	8,33%	1	5
16	6,25%	1	1
24	4,16%	0	4
32	3,12%	1	2
48	2,08%	0	0

- $CE(50) = 7,215$

Teste 02

- Data do teste: 25/05/2010.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja FSA-B (lixiviação 1/4)
- Início do teste: 21h.
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 17 – Resultados do Teste Agudo – FSA-B

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	5	7
16	6,25%	5	9
24	4,16%	7	9
48	2,08%	7	4

- CE(50) = não foi possível calcular

Teste 03

- Data do teste: 01/06/2010.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja FSA-B (lixiviação $\frac{1}{4}$) - Filtrada
- Início do teste: 10 h.
- Número de organismos por concentração: 5 por réplica.

Quadro 18 – Resultados do Teste Agudo – FSA-B

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
8	12,50%	5	3
12	8,33%	0	1
16	6,25%	0	1
24	4,16%	0	0
48	2,08%	0	0

- CE(50) = 10,50

Teste 04

- Data do teste: 08/06/2010.
- Amostra: Fração solúvel do biodiesel de soja FSA-B (lixiviação $\frac{1}{4}$)
- Início do teste: 21 h.
- Número de organismos por concentração: 10 por réplica.

Quadro 19 – Resultados do Teste Agudo – FSA-B

FD	Concentração	Organismos Imóveis	
		48h (A)	48h (b)
0	Controle	0	0
12	8,33%	5	5
16	6,25%	2	2
24	4,16%	0	2
32	3,12%	1	2
48	2,08%	1	1

- $CE(50) = 8,33$

9.3 Testes de Toxicidade Crônica com *D. Magna*

9.3.1 Resultados para Amostra FSA-A

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 192	pH: 6,30
Sensibilidade: CE(50)= 0,812	Lote utilizado: 184
Data de início do teste: 15/04/2009	Resp.: Juliana e Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	15	Q	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	16	Q			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	17	S	X	X	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	18	S			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	19	D			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	20	S	X	X	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Preparação para reprodução	21	T			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	22	Q	X	X	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	23	Q			8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	24	S	X	X	9	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	7	10
Ápice Reprodução	25	S			10	0	0	6	8	9	0	0	0	0	0	23	10
	26	D			11	12	0	0	0	0	10	14	9	10	1	56	10
	27	S	X	X	12	0	27	14	15	17	0	1	0	0	0	74	10
	28	T			13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	10
Boa Reprodução	29	Q	X	X	14	15	0	0	0	0	0	16	6	10	0	47	10
	30	Q			15	3	22	18	20	23	8	0	0	0	0	94	10
	1	S	X	X	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	10
	2	S			17	8	0	0	0	0	0	6	10	8	0	32	10
	3	D			18	0	16	18	16	21	†	0	†	0	0	71	8

	4	S	X	X	19	0	0	0	0	0	†	0	†	12	0	12	8
	5	T			20	0	0	0	0	0	†	22	†	13	0	35	8
	6	Q			21	16	0	3	14	0	†	0	†	0	0	33	8
Total de Filhotes por réplica:						54	72	59	73	70	18	59	25	53	19	502	
Número de posturas após 21 dias:						4	4	5	5	4	2	4	3	4	3		
Comprimento (mm) após 21 dias:						4,0	5,0	5,0	4,0	5,0	3,5	4,0	3,5	4,0	3,5		

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)																	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel										Aspecto Geral: Amostra "branca"							
Fator de Diluição: 128										pH: 6,30							
Sensibilidade: CE(50)= 0,821										Lote utilizado: 184							
Data de início do teste: 15/04/2009										Resp.: Juliana e Gabriela							

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	15	Q	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	16	Q			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	17	S	X	X	2	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	18	S			3	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	19	D			4	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	20	S	X	X	5	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Preparação para reprodução	21	T			6	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	22	Q	X	X	7	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	23	Q			8	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	24	S	X	X	9	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Ápice Reprodução	25	S			10	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	26	D			11	†	0	1	0	12	0	0	0	9	6	28	9
	27	S	X	X	12	†	0	0	7	0	5	8	4	0	0	24	9
	28	T			13	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9

Boa Reprodução	29	Q	X	X	14	†	2	10	0	24	0	0	0	21	9	66	9
	30	Q			15	†	0	0	14	0	3	13	7	0	0	37	9
	1	S	X	X	16	†	0	14	0	0	0	0	0	0	0	14	9
	2	S			17	†	7	0	0	18	0	11	10	18	1	65	9
	3	D			18	†	0	0	19	0	5	0	0	0	0	24	9
	4	S	X	X	19	†	0	0	0	0	†	0	0	0	1	1	8
	5	T			20	†	13	19	26	0	†	7	8	28	0	101	8
	6	Q			21	†	0	0	14	0	†	1	0	0	5	20	8
Total de Filhotes por réplica:						†	22	44	80	54	13	40	29	76	22	380	
Número de posturas após 21 dias:						†	3	4	4	3	3	4	4	4	5		
Comprimento (mm) após 21 dias:						†	4,0	5,0	4,0	4,5	3,0	4,0	4,0	4,0	3,5		

este Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 96	pH: 6,30
Sensibilidade: CE(50)= 0,812	Lote utilizado: 184
Data de início do teste: 15/04/2009	Resp.: Juliana e Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	15	Q	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	16	Q			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	17	S	X	X	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	18	S			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	19	D			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	20	S	X	X	5	0	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Preparação para reprodução	21	T			6	0	†	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	22	Q	X	X	7	0	†	0	0	†	0	0	0	0	0	0	8

		23	Q			8	0	†	0	0	†	0	0	0	0	0	0	8
		24	S	X	X	9	0	†	0	0	†	0	0	0	0	0	0	8
Ápice Reprodução		25	S			10	0	†	0	0	†	0	0	0	0	0	0	8
		26	D			11	0	†	0	0	†	0	†	0	0	0	0	7
		27	S	X	X	12	0	†	0	7	†	10	†	10	10	0	37	7
		28	T			13	0	†	0	0	†	0	†	0	0	0	0	7
Boa Reprodução		29	Q	X	X	14	3	†	0	0	†	0	†	0	0	0	3	7
		30	Q			15	0	†	0	11	†	17	†	14	11	0	53	7
		1	S	X	X	16	6	†	†	0	†	0	†	0	0	0	6	7
		2	S			17	0	†	†	0	†	0	†	11	0	0	11	7
		3	D			18	0	†	†	0	†	14	†	0	4	†	18	6
		4	S	X	X	19	0	†	†	4	†	1	†	0	0	†	5	6
		5	T			20	10	†	†	0	†	0	†	0	0	†	10	6
		6	Q			21	0	†	†	0	†	20	†	13	10	†	43	6
Total de Filhotes por réplica:							19	0	0	22	0	62	0	48	35	0	186	
Número de posturas após 21 dias:							3	†	†	3	†	4	†	4	4	†		
Comprimento (mm) após 21 dias:							4,0	†	†	4,0	†	3,5	†	3,0	3,0	2,0		

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 64	
pH: 6,30	
Sensibilidade: CE(50)= 0,812	Lote utilizado: 184
Data de início do teste: 15/04/2009	Resp.: Juliana e Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana		Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
							Réplicas											
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		

Filhote	15	Q	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	16	Q			1	0	0	0	0	†	†	†	0	0	0	0	7
	17	S	X	X	2	0	0	0	0	†	†	†	0	0	0	0	7
	18	S			3	0	0	0	0	†	†	†	0	0	0	0	7
	19	D			4	0	0	0	0	†	†	†	0	0	0	0	7
	20	S	X	X	5	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
Preparação para reprodução	21	T			6	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
	22	Q	X	X	7	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
	23	Q			8	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
	24	S	X	X	9	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
Ápice Reprodução	25	S			10	0	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	6
	26	D			11	†	0	†	0	†	†	†	0	5	0	5	5
	27	S	X	X	12	†	0	†	0	†	†	†	0	0	1	1	5
	28	T			13	†	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	5
Boa Reprodução	29	Q	X	X	14	†	1	†	0	†	†	†	0	6	0	7	5
	30	Q			15	†	0	†	0	†	†	†	0	0	3	3	5
	1	S	X	X	16	†	0	†	0	†	†	†	0	0	0	0	5
	2	S			17	†	2	†	0	†	†	†	0	0	0	2	5
	3	D			18	†	0	†	0	†	†	†	0	5	0	5	5
	4	S	X	X	19	†	†	†	2	†	†	†	†	0	0	2	3
	5	T			20	†	†	†	0	†	†	†	†	0	0	0	3
	6	Q			21	†	†	†	0	†	†	†	†	7	0	7	3
Total de Filhotes por réplica:						†	3	†	2	†	†	†	†	23	4	32	
Número de posturas após 21 dias:						†	2	†	1	†	†	†	†	4	2		
Comprimento (mm) após 21 dias:						†	2,5	†	2	†	†	†	2,0	3	2,5		

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)																	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel						Aspecto Geral: Amostra "branca"											
Fator de Diluição: Controle						pH: 6,30											
Sensibilidade: CE(50)= 0,821						Lote utilizado: 184											
Data de início do teste: 15/04/2009						Resp.: Juliana e Gabriela											

Períodos Ciclo Reprodutivo		Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
							Réplicas											
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filtote		15	Q	X	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		16	Q			1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		17	S	X	X	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		18	S			3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		19	D			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		20	S	X	X	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
Preparação para reprodução		21	T			6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		22	Q	X	X	7	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	10	
		23	Q			8	8	9	14	13	9	11	0	10	7	9	90	
		24	S	X	X	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
Ápice Reprodução		25	S			10	19	24	0	0	18	26	11	33	18	16	165	
		26	D			11	0	0	23	32	0	0	0	0	0	0	55	
		27	S	X	X	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		28	T			13	0	0	0	0	5	1	21	0	2	0	29	
Boa Reprodução		29	Q	X	X	14	14	8	7	9	7	16	0	12	10	11	94	
		30	Q			15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
		1	S	X	X	16	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	
		2	S			17	3	2	0	2	4	1	0	2	1	5	20	
	3	D			18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	4	S	X	X	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	

	5	T			20	14	14	18	8	16	17	2	15	16	14	134	10
	6	Q			21	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	3	10
Total de Filhotes por réplica:						58	58	62	64	59	72	43	72	55	56	599	
Número de posturas após 21 dias:						5	5	4	5	5	5	5	5	5	5		
Comprimento (mm) após 21 dias:						5,0	5,0	5,0	5,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0		

9.3.1 Resultados para Amostra FSA-B

Teste Crônico com *Daphnia magna* Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)

Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 64	
Sensibilidade: CE(50)= 0,84	Lote utilizado: 03
Data de início do teste: 27/04/2010	Resp.: Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	27	T			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	Q	X	X	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	29	Q			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	30	S	X	X	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	1	S			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	2	D			5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Preparação para reprodução	3	S	X	X	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	4	T			7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	5	Q	X	X	8	11	0	0	0	0	5	0	0	0	m	16	9
	6	Q			9	0	5	0	0	3	0	12	9	9	m	38	9
Ápice Reprodução	7	S	X	X	10	0	0	7	9	0	0	0	0	0	m	16	9
	8	S			11	23	15	0	0	0	18	0	18	0	m	74	9
	9	D			12	0	0	0	15	9	0	28	0	9	m	61	9

	10	S	X	X	13	0	0	20	0	0	0	0	0	0	m	23	9
Boa Reprodução	11	T			14	28	18	0	0	0	22	0	25	0	m	90	9
	12	Q	X	X	15	0	0	18	15	14	0	19	0	16	m	80	9
	13	Q			16	14	0	0	0	0	17	0	12	0	m	45	9
	14	S	X	X	17	0	21	0	0	0	0	0	0	20	m	41	9
	15	S			18	0	0	22	20	8	0	6	0	0	m	56	9
	16	D			19	13	39	0	0	0	11	0	10	0	m	73	9
	17	S	X	X	20	0	0	0	0	14	0	25	0	32	m	71	9
	18	T			21	0	0	0	28	0	0	0	0	0	m	28	9
Total de Filhotes por réplica:						89	98	67	87	48	73	90	74	86	0	712	
Número de posturas após 21 dias:						5	5	4	5	5	5	5	5	5	m		
Comprimento (mm) após 21 dias:						4	4,5	4,5	4	3,5	4	3,5	4	4	m		

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 96	
Sensibilidade: CE(50)= 0,84	Lote utilizado: 03
Data de início do teste: 27/04/2010	Resp.: Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	27	T			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	Q	X	X	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	29	Q			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	30	S	X	X	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	1	S			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	2	D			5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
ão para repr oduç ão	3	S	X	X	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10

	4	T			7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	5	Q	X	X	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10
	6	Q			9	14	7	0	9	15	0	13	0	0	10	64	10
Ápice Reprodução	7	S	X	X	10	0	0	0	0	0	6	16	0	12	0	34	10
	8	S			11	0	16	0	17	0	0	0	0	0	27	60	10
	9	D			12	28	0	0	0	27	24	0	8	23	0	110	10
	10	S	X	X	13	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	35	10
Boa Reprodução	11	T			14	0	26	0	23	0	0	0	17	0	18	82	10
	12	Q	X	X	15	19	0	0	0	24	30	0	0	20	0	93	10
	13	Q			16	0	21	0	27	0	0	27	0	0	0	75	10
	14	S	X	X	17	10	0	0	0	6	0	0	22	0	14	52	10
	15	S			18	0	0	0	0	0	7	0	0	4	0	11	10
	16	D			19	0	21	0	25	0	0	34	0	0	0	80	10
	17	S	X	X	20	43	0	0	0	41	42	0	31	0	24	181	10
	18	T			21	0	0	0	0	0	0	0	0	32	0	32	10
Total de Filhotes por réplica:						114	91	0	101	113	109	123	78	91	93	913	
Número de posturas após 21 dias:						5	5	macho	5	5	5	5	4	5	5		
Comprimento (mm) após 21 dias:						3,5	4,5	macho	4,5	4,5	4	0,4 - m	4	4	5		

Teste Crônico com *Daphnia magna* Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)

Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 128	
Sensibilidade: CE(50)= 0,84	Lote utilizado: 03
Data de início do teste: 27/04/2010	Resp.: Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo	Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
						Réplicas											
						1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	27	T			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	28	Q	X	X	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	29	Q			2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	30	S	X	X	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	1	S			4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	2	D			5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Preparação para reprodução	3	S	X	X	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	4	T			7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
	5	Q	X	X	8	13	9	0	9	0	0	15	0	13	10	69	10
	6	Q			9	0	0	11	0	0	8	0	16	0	0	35	10
Ápice Reprodução	7	S	X	X	10	11	16	0	13	12	0	14	0	0	0	78	10
	8	S			11	0	0	19	0	0	15	0	0	0	34	56	10
	9	D			12	0	0	0	0	26	0	0	6	0	0	32	10
	10	S	X	X	13	30	37	0	32	0	0	29	0	30	0	158	10
Boa Reprodução	11	T			14	0	0	21	0	0	28	m	0	m	35	84	8
	12	Q	X	X	15	0	0	0	0	20	0	m	21	m	0	41	8
	13	Q			16	8	9	20	35	0	21	m	0	m	18	111	8
	14	S	X	X	17	0	0	0	0	0	0	m	0	m	0	0	8
	15	S			18	0	0	0	0	10	0	m	m	m	0	10	7
	16	D			19	22	16	14	24	0	10	m	m	m	9	95	7

	17	S	X	X	20	0	0	0	0	0	0	m	m	m	0	0	7
	18	T			21	0	0	0	0	31	0	m	m	m	0	31	7
Total de Filhotes por réplica:						84	87	85	113	99	82	58	43	43	106	800	
Número de posturas após 21 dias:						5	5	5	5	5	5	3	3	-	5		
Comprimento (mm) após 21 dias:						4,5	5	4,5	4	4,5	4	m	m	m	4,5		

Teste Crônico com <i>Daphnia magna</i> Stratus, 1820 (Crustacea, Cladocera)	
Amostra: Fração Solúvel Biodiesel	Aspecto Geral: Amostra "branca"
Fator de Diluição: 192	
Sensibilidade: CE(50)= 0,84	Lote utilizado: 03
Data de início do teste: 27/04/2010	Resp.: Gabriela

Períodos Ciclo Reprodutivo		Data	Dia da semana	Troca Meio	Alimentação	T	Número de nascimentos										Total de Jovens	Adultas Sobreviventes
							Réplicas											
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Filhote	27	T				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	28	Q	X	X		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	29	Q				2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	30	S	X	X		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	1	S				4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	2	D				5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
Preparação para reprodução	3	S	X	X		6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	4	T				7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
	5	Q	X	X		8	11	0	0	7	11	10	15	0	6	7	67	10
	6	Q				9	0	10	10	0	0	0	0	15	0	0	35	10
	7	S	X	X		10	18	0	0	17	0	14	0	0	12	17	78	10
Ápice Reprodução	8	S				11	0	12	0	0	25	0	23	0	0	0	60	10

	9	D			12	0	0	9	0	0	0	0	10	0	0	19	10
	10	S	X	X	13	43	0	0	33	0	25	0	0	31	36	168	10
Boa Reprodução	11	T			14	0	26	0	0	25	0	27	0	0	0	78	10
	12	Q	X	X	15	0	0	32	0	0	0	0	17	0	0	49	10
	13	Q			16	42	19	0	28	10	25	0	0	24	37	185	10
	14	S	X	X	17	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	10
	15	S			18	0	0	21	0	0	0	0	15	0	0	36	10
	16	D			19	23	23	0	0	28	20	4	0	21	14	133	10
	17	S	X	X	20	0	0	0	0	0	0	0	32	0	0	23	10
	18	T			21	0	0	0	18	0	0	0	0	11 -m	0	27	10
Total de Filhotes por réplica:						137	90	72	103	99	94	74	89	94	111	963	
Número de posturas após 21 dias:						5	5	4	5	5	5	5	5	6	5		
Comprimento (mm) após 21 dias:						5,5	4	4	4	4	4	4,5	4	4,5	5		